

Bulletin of the Agricultural Chemical Society of Japan.

TRANSACTIONS

On the Alcoholic Fermentation of the Amino-acids.

Part IV. Decomposition of Glycocoll.

By Masakazu YAMADA.

(Governmental Institute of Brewing, Takinogawa, Tokyo.)

(Received October 29, 1934)

K. Kurono found that the volatile fermentation products from glycocoll by saké yeast showed the characteristic color reaction of fusel oil with anisaldehyde- H_2SO_4 reagent and were estimated as fusel oil by Röse's method. He concluded that the products might be ethyl acetate and acetic acid⁽¹⁾.

As to the color reaction with anisaldehyde or vanilline- H_2SO_4 reagent, the author's experiment reached the same result as Kurono's observation⁽²⁾ but ethyl acetate or acetic acid was proved not to have such color reaction as fusel oil with the reagents.

The fusel oil fraction produced by saké yeast in the modified Hayduck solution with 0.3% of glycocoll in place of asparagine was showed to consist mainly of an amyl alcohol which boiled at over 118°C .

From the properties of derivatives and rotatory power this was indentified no other than somewhat impure isoamyl alcohol. It is yet a question whether this amyl alcohol comes directly from glycocoll or not.

EXPERIMENTAL

- (1) Glycocoll was prepared from its ethylester-hydrochloride.
- (2) Medium: Modified Hayduck solution with 0.3% of Glycocoll in place of asparagine.
- (3) 2.5 L. of culture medium in 5 L. flask was sterilized in ordinary manner, into which was poured 100 c.c. of yeast culture propagated from 1 loopful of saké yeast. Total medium is 32.2 L. After 15~6 days the fermentation was over and the fermented liquid did not contain sugar. The dis-

tillation and the treatment of the residue are the same as the case of alanine⁽³⁾.

- (4) Fermentation products: fusel oil 0.07%, total acid 0.1152%
 yield of alcohol 1331 c.c. (ca. 95%)
 " " oil (B. P. over 100°C) 6.2 g.
 " " yeast as dry matter 88.5 g.
- (5) Fractionation of the oil:

Fract.	B. P.	Yield (g.)	Fract.	B. P.	Yield (g.)
I	100~118	0.3	V	128.5~131	2.0
II	118~121	0.2	VI	residue	0.4
III	121~125.5	1.2		total	5.8
IV	125.5~128.5	1.7			

- (6) Identification of the fractions.

The following derivatives of alcohol were prepared.

a. 3·5-dinitro-benzoate:—

Fract.	M. P.	Analysis				
		Subst. (g)	N (cc)	T	P (mm)	N(%) found
III	58°	0.0568	5.00	22	756	9.94
IV	61.5	0.0764	6.65	22	759	9.87
V	63	0.0491	4.30	22	759	9.93
isoamylalcohol	62					9.93 (C ₁₂ H ₁₄ O ₆ N ₂)

b. Phenyl-carbamate:—

Fract.	M. P.	Analysis				
		Subst. (g)	N (cc)	T	P (mm)	N(%) found
IV	46°	0.0766	4.55	17°	764.5	6.96
V	50	0.0826	4.85	17	767	6.80
isoamylalcohol	55~57					6.76 (C ₁₂ H ₁₇ O ₂ N)

c. α -naphthyl carbamate from fract. V: M. P. 59° (isoamylalc.: 68°)

- (7) Rotation of alcohol (Mixture of fract. II~V)

$$[\alpha]_D^{20} = -1.09^\circ \quad \gamma = -0.57^\circ \quad l = 2.2 \text{ dm} \quad C = 23.787 \text{ (alcohol solution)}$$

- (8) Amino-acid recovered from the distilling residue: 36.5 g.

- (9) Succinic acid: The ether-extract of the residue was neutralized

with baryta and evaporated. Then Ba salts of acids were extracted with 80% alcohol. The insoluble part was acidified with H_2SO_4 and again extracted with ether. M.P. 186° . Yield. 11 g.

BIBLIOGRAPHY

- (1) K. Kurono: Journ. Agricult. Tokyo, **1**, 283~94 (1912).
- (2) M. Yamada: Bull. Agricult. chem. Soc. Japan, **8**, 95~7 (1932).
- (3) M. Yamada: Bull. Agricult. chem. Soc. Japan, **8**, 97~100 (1932).

On the Alcoholic Fermentation of the Amino-acids.

Part V. Decomposition of *d*-l-leucine by saké yeast.

By Masakazu YAMADA.

(Received October 29, 1934)

The alcoholic fermentation of leucine is the well-known typical example. F. Ehrlich obtained isoamyl alcohol as a volatile decomposition product and *d*-isomeride from *d*-l-leucine when the latter was fermented with sugar by yeast⁽¹⁾. The result by saké yeast was all the same as Ehrlich's observation. The yeast was propagated from 1 loopful in liters of modified Hayduck solution with 0.4 % of *d*-l-leucine in place of asparagine so as to raise the yield of fusel oil and 90% of theoretical yield of amyl alcohol was obtained. Purity of the alcohol was known from its optical rotation $[\alpha]_D^{20} = -0.05^\circ$.

Optical rotation of *d*-leucine separated from the residue.

$$[\alpha]_D^{20} = -15.55^\circ^{(2)}.$$

EXPERIMENTAL

(1) *d*-l-leucine was synthesized from iso-amyl alcohol fraction of fusel oil. It's rotation $[\alpha]_D^{20} = -100^\circ$.

(2) The details of experiment are the same as the case of alanine⁽³⁾.

(3) 23.1 L of fermentation liquid was distilled at 15 days after inoculation of yeast.

(4) Fermentation products: Alcohol 5.3%, fusel oil 0.13%, total acid 0.0826%

Yield of alcohol	1293 cc (ca 93%)
------------------	------------------

„ „ oil (B. P. above 100°)	25.8 g
------------------------------------	--------

„ „ yeast	38 g
-----------	------

(5) Fractionation of the oil.

Fract.	B.P.	Yield (g)	Fract.	B.P.	Yield (g)
I	90~105°	0.2	VI	134~135°	0.2
II	105~120°	0.5	VII	residue	0.6
III	120~127°	1.0		total	25.6
IV	127~129.5°	3.4		loss	0.2
V	129.5~134°	19.7			

(6) Identification of the fraction V.

The following derivatives of alcohol were prepared:—

3·5 dinitro-benzoate and phenyl carbamate.

Derivatives	M. P.	On the Alcoholic Fermentation of the Amino-acids				
		subst. (g)	N, (cc)	T	P (mm)	N (%) found
3~5, dinitro-b,	63°	0.0648	5.6	19°	769.6	10.09
" (literature)	62°					9.93
						(C ₁₂ H ₁₄ O ₆ N ₂)
phen, carbamate	57.5°	0.1011	5.8	17°	773.6	6.80
" (literature)	55°					6.76
						(C ₁₂ H ₁₇ O ₂ N)

(7) Optical rotation of the alcohol:

$$[\alpha]_D^{20} = -0.05^\circ \quad r = -0.11^\circ \quad l = 2.2 \text{ dm} \quad C = 100\%$$

(8) Amino-acid recovered from the distilling residue was 42.5 g and its rotation in 20% HCl solution was as follows. $[\alpha]_D^{20} = -15.55^\circ \quad r = 2.00$
 $l = 2.2 \text{ dm} \quad C = 5.845\%$

(9) Yield of succinic acid: 2.0 g

BIBLIOGRAPHY

- (1) F. Ehrlich: Biochem. Z., 1, 8 (1906).
- (2) F. Ehrlich: Biochem. Z., 1, 26 (1906).
- (3) M. Yamada, Bull. Agricult. Chem. Soc. Japan, 8, 97~100 (1932).

On the Alcoholic Fermentation of the Amino-Acids.

Part VI. Decomposition of α -amino-normal-valeric acid by saké yeast.

By Masakazu YAMADA

(Received October 29, 1934)

On the alcoholic fermentation of amino-acids of normal type by yeast, we have not yet been able to find an example which is decomposed according to Ehrlich's view; that is to say, an amyl alcohol from glycocoll, isobutyl

alcohol from alanine and active amyl alcohol from α -amino-*n*-butyric acid were obtained.

Now α -amino-*n*-valeric acid was treated. It was shown that this amino-acid was fermented in a regular manner as the case of leucine.

Thus, normal butylalcohol was produced.

EXPERIMENTAL

- (1) α -amino-*n*-valeric acid was prepared from nor-butyl alcohol.
- (2) Medium: Modified Hayduck solution with 0.32% of nor-valine in place of asparagine.
- (3) Cultivation of yeast was submitted to the case of leucine.
- (4) After 14 days, 30 L of fermentation liquid was distilled.
- (5) Fermentation products:
 alcohol 5.0%, fusel oil 0.03%, total acid 0.1416%
 Yield of alcohol 1627 cc (ca 94%)
 " " oil (B. P. above 100°) 10.7 g
 " " yeast 49 g
- (6) Fractional distillation of the oil.

Fract.	B.P.	Yield	Fract.	B.P.	Yield
I	100~105°	0.7 g	V	120~124	0.9
II	105~115	0.6	VI	124~128	0.7
III	115~118	5.1	VII	residue	0.2
IV	118~120	2.6		total	10.8

- (7) Identification of the fraction III and IV.

a. 3:5-dinitro-benzoate :

Fraction	M. P.	Analysis				
		Subst.(g)	N (cc)	T	P (mm)	N (%) found
III	70°	0.0673	5.90	13°	765	10.46%
IV	70.5	0.0246	2.15	10°	763.5	10.55%
<i>n</i> -butyl alcohol (literature)	62°					10.45%
" (Merck)	71°					(C ₁₁ H ₁₂ O ₆ N ₂)
" (a sample)	70°					

M.P. of 71° is a new value.

b. Phenylcarbamate :

Fraction	M. P.	Analysis				
		Subst.(g)	N. (cc)	T	P (mm)	N (%) found
III	57	0.0607	3.75	18	762	7.18
IV	56	0.0940	5.85	16	758.4	7.26
n-butylalc. (literature)	56					7.25 (C ₁₁ H ₁₅ O ₂ N)

c. α -naphthylcarbamate of fract. III.

M. P. 70° (literature 72°).

(8) Yield of succinic acid: 3.5 g.

On the Alcoholic Fermentation of Amino-acids.

Part VII. Decomposition of *d*-l-valine by saké yeast.

By Masakazu YAMADA

(Received October 29, 1934)

If isoamyl alcohol is derived from leucine in the alcoholic fermentation, it is the most probable that isobutyl alcohol ought to come from valine, while in the author's previous experiment showed that alanine was the mother substance of the latter⁽¹⁾. So decomposition of valine by yeast must be examined again. F. Ehrlich obtained *l*-valine as the decomposition product by yeast from *d*-l-valine but did not discuss any volatile products.

The author's experiment showed that valine was a quite poor nitrogen nutriment for yeast and so decomposition was not smooth and complete. The fusel oil fraction obtained in the modified Hayduck solution with *d*-l-valine in place of asparagine did not contain any trace of isobutyl alcohol but consisted of an amyl alcohol which boiled at ca. 123~130°. The chemical position of the alcohol has not yet been decided. It must be careful that in this case quite enormous quantity of succinic acid was produced.

EXPERIMENTAL

(1) *d*-l-valine was prepared from isobutyl alcohol (B. P. 107~8°).

(2) Medium: Modified Hayduck solution with 0.32% of valine in place of asparagine.

(3) In 30 L of medium 33.5 g as dry matter of saké yeast was inoculated. After 20 days, whole sugar was disappeared.

(4) Fermentation products:

alcohol 4.2%, fusel oil 0.05%, total acid 0.2596%

yield of alcohol 1603 cc (ca 94%)

„ „ oil (B. P. above 100°) 11.1 g

„ „ yeast 40 g (together with the yeast added)

(5) Fractional distillation of the oil.

Fract.	B. P.	Yield (g)	Fract.	B. P.	Yield (g)
I	95~109°	0.1	VI	127.5~128.5	2.0
II	109~121	0.3	VII	128.5~129.5	3.1
III	121~123	0.4	VIII	129.5~130	1.5
IV	123~125	0.5	IX	130~130.5	1.0
V	125~127.5	1.5	X	residue	0.6

(6) Identification of the fractions.

The following derivatives of alcohol were prepared.

a. 3:5-dinitrobenzoate:—

Fraction	M. P.	Analysis				
		Subst (g)	N (cc)	T	P (mm)	N (%) found
V	61°					
VI	65	0.0353	3.10	15	772	10.01
VII	63	0.0448	3.80	15	765.7	10.03
VIII	64	0.0430	3.70	16	766.6	10.14
isobutyl ester	87					10.45
isocamyl ester	62					(C ₁₁ H ₁₂ O ₆ N ₂) 9.93 (C ₁₂ H ₁₄ O ₆ N ₂)

b. Phenyl carbamate:

Fraction	M. P.	Analysis				
		Subst. (g)	N (cc)	T	P (mm)	N (%) found
V	40°	0.0811	4.85	16	762.3	7.01
VI	40	0.0856	5.00	16	765.4	6.87
VII	41.5	0.0812	4.65	14	760.0	6.76
VIII	45	0.0688	4.00	14	765.0	6.90
IX	46					6.76
isocamyl ester	55					7.25 (C ₁₂ H ₁₇ O ₂ N)
isobutyl ester	80					7.25 (C ₁₁ H ₁₅ O ₂ N)

c. α -naphthyl carbamate of Fract. VI. M. P. 61° (isoamylalc. 68°)

(7) Optical rotation of mixture: Subst. Mixture of fract. III~VIII.

$[\alpha]^{26.5^\circ} = -2.57^\circ$ $r = -2.22^\circ$ $l = 2.2$ dm $C = 39.21\%$ (alcohol solution)

(8) Valine recovered from the residue: 77 g.

(9) Succinic acid (M. P. 187°) obtained: 30.36 g.

The acid may perhaps be formed from sugar alone.

BIBLIOGRAPHY

- (1) M. Yamada: Bull. Agricult. Chem. Soc. 8, 97~100 (1932).

On the Alcoholic Fermentation of Amino-acids.

Part VIII. Decomposition of glutaminic acid
and asparagine by saké yeast.

By Masakazu YAMADA

(Received October 29, 1934)

In the series of the author's previous experiments, the mother substance of normal propyl alcohol as an ordinary constituent of fusel oil has not yet been found. On the one hand, *n*-propyl alcohol shows quite faint color reaction with vanilline-H₂SO₄ reagent and so the previous preliminary experiment with glutaminic acid or asparagine ought to be examined again. In those cases no remarkable production of fusel oil were perceived⁽¹⁾. F. Ehrlich supposed first that glutaminic acid was the mother substance of *n*-propyl alcohol, but he obtained succinic acid instead of the alcohol contrary to his expectation.

The author's experiment showed that glutaminic acid or asparagine was not the mother substance of *n*-propyl alcohol and gave very poor yield of fusel oil as the preliminary experiment had shown. The superior production of succinic acid was observed in the case of glutaminic acid.

EXPERIMENTAL

I. Decomposition of glutaminic acid by saké yeast.

(1) Glutaminic acid: Ajino-moto (sodium-glutamate) was used.

(2) Medium: Modified Hayduck solution with 0.5% of Na-glutamate in place of asparagine.

(3) Fermentation: The details of experiments are the same as the case of leucine. 30 L of the fermentation liquid was distilled.

(4) Products:

alcohol 4.3%, fusel oil 0.025%, total acid 0.1534%

yield of alcohol 1451 cc (ca 95%)

,, ,, oil (B. P. above 100°) 1.8 g

,, ,, yeast 88 g

(5) Fractionation of the oil.

Fract.	B. P.	Yield (g)	Fract.	B. P.	Yield (g)
I	95~120°	0.3	III	above 128°	0.7
II	120~128°	0.7		total	1.7

The main part distills in amyl alcohol fraction but perhaps may not be derived from glutaminic acid.

(6) Succinic acid obtained from the residue: 24 g M. P. 184°.

II. Decomposition of asparagine by saké yeast.

(1) Asparagine: prepared by Merck.

(2) Medium: Hayduck solution.

(3) 30 L of the fermentation liquid was distilled at 10 days after inoculation of saké yeast.

(4) Products:

alcohol: 5%, fusel oil 0.03%, total acid 0.0851%

yield of alcohol 1354 cc (ca 93%)

,, ,, oil (B. P. above 100°) 0.4 g

,, ,, yeast 84.5 g

(5) From the residue 0.2 g of acetic acid as volatile acid and 4.0 g of succinic acid (M. P. 183°) were obtained. When crystals of succinic acid were treated with cinchonine, minute quantity of cinchonine-malate was crystallized out. After recrystallization from acetone, it melts at 197~8°. (Cinchonine malate).

BIBLIOGRAPHY

- (1) M. Yamada: Bull. Agricult. Chem. Soc. 8, 95~97 (1932).

On the Alcoholic Fermentation of Amino-acids.

By Masakazu YAMADA

Summerized results are as follows

Substrate	high alcohol produced	M. P. of derivatives			yield (g)	
		3-5-dinitro benz.	phenyl carbamate.	α -naphthyl carbamate.	succinic acid (total liquid)	Yie' ()
glycocoll	amylalc.	58~63°	46~50°	59°	11g (32.2 L)	88.5 g
d-alanine	isobutylalc.	83~4	80	—	— (30 L)	—
d-l-alanine	isobutylalc.	86	83	—	1.5 (37.5 L)	82.4

<i>d-l</i> -α amino- <i>n</i> -butyric acid	act. amylalc.	81.5	32.5	79	0.6(13.2 L)	—
<i>d-l</i> -valine	<i>n</i> -butylalc.	70.5	57	70	3.5(30)	49
<i>d-l</i> . valine	amylalc. B. P.(123~30°)	65	40~43	59	30.36(30)	40*
<i>d-l</i> . leucine	isoamylalc.	63	57.5	—	2.0(23)	38
asparagine	—	—	—	—	4.0(30)	84.5
glutaminic acid	amylalc.	—	—	—	24(30)	88
control	trace of amylalc.				3.0(20)	54*

* together with added yeast.

On the Glycerin Fraction in saké.

By Masakazu YAMADA

(Received October 29, 1934)

(1) The glycerin fraction of saké (10 L) and moto-mash (50 L) were isolated by ordinary alcohol-ether extraction method from the extracts and 0.384% in saké and 0.754% in moto-mash were found. The fraction consists of 2·3-butylenglycol (B. P. 177~185°) and glycerin (B. P. 156~169°/7 mm). The ratio of two compounds are 1:20 in saké and 1:10 in moto mash.

(2) Diphenyl-carbamate of 2·3-butylenglycol prepared melts at 201° and contains nitrogen 8.61% (8.54% calculated for $C_{18}H_{20}N_2O_4$).

(3) Specific rotatory power of butylenglycol:

$$[\alpha]_D^{20} = +9.70$$

(4) Both constituents are necessary for the refined sweet taste of saké.

On the Variation of Sugar-content in saké.

By Masakazu YAMADA

Katsuichirō TAKAGISHI

(Governmental Institute of Brewing, Takinogawa, Tokyo.)

(Received October 29, 1934)

The sweet taste of saké is mainly due to sugar in it, while we found that sugar content was not constant but increased day by day with average speed of 0.0284% a day until pasteurization after the stage of compression of 'moromi.'*

* Moromi=saké lees.

Representative data are followings. (average of 11 samples).

	date	sp. gr.	alcohol %	total acid,	extract	sugar	dextrine
Compression of moromi	—28. Feb.	0.9991	17.14	0.1527	5.4370	1.136	2.580
Before Pasteurization	10. April	0.9994	16.61	0.1450	5.3846	2.657	1.239
After pasteurization	"	0.9998	16.54	0.1450	5.3930	2.575	
First test of ripening	5. June	0.9996	16.478	0.1421	5.2123	2.698	1.190

These phenomena are due to the diastatic enzyme in the fresh saké. Of course, sugar is produced from dextrin by the enzyme.

Dextrin in saké has a quite small molecule because Jodoreaction of the filtrate of moromi or saké shows always yellow in all stages of brewing.

The enzyme is destroyed by little heating in pasteurization and increase of sugar stops consequently.

The relation between enzymatic power and its inactivation by heating is as follows.

figure . . . succharifying power displayed with Wohlgemuth-number.
time of pasteurization: 15 minutes.

Sample of saké	Before Pasteurization	Pasteurization				
		30°	40°	45°	47°	50°
No. 7	10	10	10	2.0	0.071	0
No. 10	6.6	6.6	4.0	0.71	0.083	0
No. 11	2.5	2.2	1.7	0.55	0.053	0

The diagram shows that heating at 45° weakens diastatic power partially and at 50° destroys the enzyme completely.

Though ordinary optimum temperatures of various diastases are 55°, in this case existence of ca 14~18% of alcohol in saké may force the destructive power of heating.

ABSTRACTS

from

TRANSACTIONS published in JAPANESE

(Pages refer to the Japanese originals of this volume unless otherwise noticed)

Untersuchungen über die Enzyme von Bombyx mori L. XI. Mittheilung.—Über die Magenlipase. (2), (S. 77~85): Von K. YAMAFUJI und Y. YONEZAWA. (Aus dem Biochem. Institut der Landw. Abteilung der Kaiserl. Kyushu-Universität zu Fukuoka, Japan.)

Das Studium der Esterasen ist in den letzten Jahren durch ihre Wirkungsspezifität auffallend gefördert worden. Überblickt man jedoch die einschlägige Literatur, so fällt der Mangel an Versuchsergebnissen über die Lipasen bei Wirbellosen auf.

Infolge der grundlegenden Untersuchungen von Willstätter und seinen Mitarbeitern sind die Tatsachen bekannt geworden, dass die fettspaltenden Enzyme der Wirbeltiere durch ihr Verhalten verschiedenen Substraten gegenüber in zwei Gruppen eingeteilt werden können: eine echte Lipase (im Pankreas) und eine eigentliche Esterasen (in der Leber), und dass das Wirkungsvermögen dieser Enzyme von den Begleitstoffen in hohem Masse abhängig ist. Seitdem haben mehrere Forscher, wie Ammon⁽¹⁾, Bamann⁽²⁾, Laeverenz, Rona⁽⁶⁾, Virtanen⁽⁷⁾, Wolvekamp⁽⁸⁾ u. a. zahlreiche wertvolle Angaben veröffentlicht, welche im wesentlichen die Frage nach der Wirkungsweise dieser Enzyme behandelten. Aus den Resultaten dieser Forschungen wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass die bisher als einheitlich betrachteten Lipasen Gemische verschiedener Lipasen vorstellen und zwar, dass die Verschiedenheiten dieser Fermente vielleicht in dem kolloidalen Träger der katalytisch aktiven Gruppe zu suchen sind.

Die oben angeführten, sehr interessanten Arbeiten beziehen sich nur auf die lipatischen Enzyme bei den Vertebraten. Es ist daher eine besonders anziehende Aufgabe, Lipasen der wirbellosen Tiere zu überprüfen, erhaltene neue Beobachtungen zum Vergleich mit den Wirbeltierfermenten zu bringen und also unsere Kenntnis von der Natur dieser Katalysatoren zu vertiefen. Wegen der technischen Schwierigkeiten in der Beschaffung grösserer Mengen von Organen, Verdauungssäften oder Blut bei den Wirbellosen sind moderne quantitative Arbeiten über die Esterasen dieser Tiere äusserst selten. Wir kennen nur die Ergebnisse, die in den Untersuchungen von Krüger⁽⁴⁾ über den Flusskrebs, von Graetz⁽³⁾ und Kuntara⁽⁵⁾ über die Weinbergschnecke und von Yamafuji⁽⁹⁾ über das Blut der Seidenraupe gewonnen wurden. Nun haben wir erstmalig die Lipase des Digestionsaftes bei Insekten systematisch untersucht.

Herrn Prof. Dr. Y. Okuda sprechen wir für die lebhafteste Förderung der vorliegenden Forschung unseren verbindlichsten Dank aus.

1) *Bereitung des Enzympräparats.* Der aus den 2,200 Larven, die zum fünften Lebensalter herangewachsen waren, gesammelte Magensaft betrug ungefähr 1 Liter. Dieser Saft wurde mit 5 Litern Aceton versetzt, filtriert und der Filtrerrückstand noch dreimal mit je 1 Liter Aceton behandelt. Darauf wuschen wir den Niederschlag mit 500 ccm Aceton + 500 ccm Aether und schliesslich mit Aether. Wir erhielten so etwa 10 g lufttrockenes, braungelbes Fermentpulver. Es ist stabil, wenn es vor Feuchtigkeit geschützt wird. Zur Herstellung der Enzym-Stammlösung wurde 1g dieses Pulvers mit 100 ccm 50%igem Glycerin gut durchgeschüttelt und nach 2 stündigem Stehen bei Zimmertemperatur klar abzentrifugiert. Diese Stammlösung bewahrten wir im Kühlraum auf, und für die Versuche verdünnten wir sie jedesmal mit Wasser. Wir mussten, infolge der sehr schwachen fettspaltenden Kraft des Magensaftes, auf die weitere Reinigung des Enzyms verzichten.

2) *Bestimmungsmethode.* Die Messung der lipatischen Wirkung fand nach der Tropfmethode statt, wobei die Hydrolyse des Tributyrins mit einem geraden Stalagmometer verfolgt wurde. In den meisten Fällen wurden 50 ccm Butyrlösung, 2 ccm 2,5 n-Ammonchlorid-Ammoniak-Puffer von pH=8,6 und 1 ccm Enzymlösung –bzw. unter Zusatz von Gift oder Aktivator– vermischt und diese Mischung 10 Minuten bei 20° stehen gelassen. Die Lipaseaktivität verglichen wir mit den Reaktionskonstanten erster Ordnung.

3) *Zeitlicher Verlauf der Tributyrinspaltung.*

Zeit, Minuten	0	10	20	30
a—x	91,0	59,5	38,5	26,0
Monomol. Reakt.- Konst. k, 10 ³	—	18,5	18,7	18,1

4) *Enzymmenge und Reaktionskonstante.*

Rel. Enzymmenge, E	1	2	3
k, 10 ³	16,1	31,9	49,8
k, 10 ³ : E	16,1	16,0	16,6

5) *Enzymmenge und Zeitwert.*

Rel. Enzymmenge	1	1,5	3,0
Zeitwert, Minuten	30	20	10
Gespalt. Tributyrin, %	49,5	48,5	47,5
k, 10 ³	18,2	27,5	54,4
Rel. k	1,2	1,5	3,0

6) Einfluss der Wasserstoffionenkonzentration.

pH	8,0	8,6	9,2	9,8	10,4	11,0
k. 10 ³	20,9	30,6	48,7	65,3	52,3	37,2

7) Hemmungsercheinungen.

Gift	Giftmenge, mg	k. 10 ³	Rel. k
Ohne Gift	—	34,4	100
Chinin-HCl	1,0	34,1	99
"	5,0	29,1	85
Atoxyl	1,0	34,1	99
"	2,5	31,1	90
Strychnin-nitrat	1,0	35,8	105
"	5,0	34,1	99
NaF	1,0	33,5	97
"	5,0	27,8	81

8) Aktivierungsercheinungen.

Aktivatorzusätze in mg					pH	k. 10 ³	Rel. k
CaCl ₂	Na-Oleat	Albumin	Pepton	Glykokoll			
—	—	—	—	—	8,6	41,0	100
—	—	—	—	1,0	"	40,4	99
—	—	—	—	5,0	"	40,6	99
—	—	—	—	—	"	41,0	100
—	—	—	1,0	—	"	36,6	89
—	—	—	10,0	—	"	31,2	72
—	—	—	—	—	"	47,1	100
—	—	5,0	—	—	"	42,2	90
—	—	10,0	—	—	"	36,1	77
—	—	—	—	—	5,6	13,7	100
—	—	10,0	—	—	"	11,1	81
—	—	—	—	—	8,6	24,5	100
—	0,1	—	—	—	"	68,6	280
—	0,5	—	—	—	"	79,5	324
—	—	—	—	—	"	37,2	100
5,0	—	—	—	—	"	36,3	98
—	—	—	—	—	"	25,1	100
0,05	0,05	—	—	—	"	71,2	284
—	—	—	—	—	5,6	12,3	100
1,0	1,0	—	—	—	"	10,3	84
—	—	—	—	—	8,6	16,9	100
10,0	10,0	—	—	—	"	74,8	443
10,0	10,0	1,0	—	—	"	81,0	479
10,0	10,0	5,0	—	—	"	80,6	477

9) *Substratspezifität.*

0,2 g Fermentpulver + 2 ccm Puffer von pH=9,8 + 1 ccm Glycerid;
dieses Gemisch wurde 3 Minuten geschüttelt. Nach 57 Minuten
Erwärmung auf 40° wurden die freigewordenen Säuren auf die übliche
Weise mit 0,1 n-KOH titriert. Indikator Thymolphthalein.

Substrat	Tributyrin	Monobutyrin	Rizinusöl	Olivenöl
0,1 n-KOH, ccm	24,1	23,9	6,9	0,4
Rel.	100,0	99,2	28,6	1,7

ZUSAMMENFASSUNG

(1) Aus dem Magensaft der Seidenraupe wurde ein Lipasepräparat
bereitet und seine lipatische Wirkung hauptsächlich mit der stalagmometrischen
Methode untersucht.

(2) Die Hydrolyse des Tributyrins durch die Magenlipase verläuft an-
nähernd monomolekular. In einem gewissen Bereich (20~60% Spaltung)
ist die Reaktionsgeschwindigkeit der Enzymmenge direkt proportional. Zwi-
schen Enzymmenge und Zeitwert besteht umgekehrte Proportionalität.

(3) Die Magenlipase zeigt im etwas gereinigten Zustand das gleiche
pH-Optimum (pH=9,8) wie im natürlichen.

(4) Strychnin, Glykokoll und CaCl₂ sind auf die Lipasewirkung ohne
Einfluss. Die Lipase ist gegen Chinin bzw. Atoxyl nur wenig, gegen NaF
etwas stärker empfindlich.

(5) Die Tributyrinspaltung wird durch Na- oder Ca-Oleat zwar im
alkalischen Medium ausserordentlich gefördert, in saurem Gebiet aber gehemmt,
während sie bei alkalischer wie bei saurer Reaktion durch Albumin oder
Pepton gehemmt wird. Ca-Oleat + Albumin aktiviert sie jedoch sehr stark.

(6) Die relative Spaltbarkeit verschiedener Substrate durch das Enzym
wurde mittels des titrimetrischen Verfahrens ermittelt und, abnehmend geord-
net, folgende Reihenfolge gefunden: Tributyrin, Monobutyrin > Rizinusöl >
Olivenöl.

(7) Aus den Hemmungs- und Aktivierungsversuchen geht hervor, dass
die Magenlipase der Seidenraupe der Pankreaslipase der Wirbeltiere ähnlich
ist.

LITERATUR

- (1) R. Ammon u. H. Fischgold: Biochem. Z., **234**, 54 (1931), u. a.
- (2) E. Bamann u. P. Laeverenz: Ber. chem. Ges., **63**, 2939 (1930), u. a.
- (3) E. Graetz: Z. physiol. Chem., **180**, 305 (1929).
- (4) P. Krüger u. E. Graetz: Zool. Jahrb. allg. Zool. Physiol., **45**, 463 (1928).
- (5) W. Kuntara: Z. physiol. Chem., **225**, 169 (1934).
- (6) P. Rona, H. Fischgold u. R. Ammon: Biochem. Z., **228**, 76 (1930).
- (7) A. J. Virtanen u. P. Suomalainen: Z. physiol. Chem., **219**, 1 (1933).
- (8) H. P. Wolvekamp u. Griffioen: Z. physiol. Chem., **223**, 36 (1934).
- K. Yamafuji: Bull. Agr. Chem. Soc. Japan, **10**, 57 (1934).

Die mikrobiologische Studien über Bereitung von Saké in Taiwan (I).—*Saccharomyces* Arten. (pp. 85~97): Von R. NAKAZAWA, Y. TAKEDA und M. SIMO.

On the Lecithin of Yolk. (pp. 98~107): By Y. YOKOYAMA.

Darstellung des Harnstoffes aus Kohlensäure und Ammoniak (II. Mitteilung). II. Kapitel. Darstellung des Harnstoffes aus Ammoniumcarbamat. (S. 107~117): Von Matsuo TOKUOKA. (Taihoku Universität, Taihoku, Taiwan.)

§ 1. Die Einflüsse des Heizdauers und der Temperatur auf die Umsetzung von Ammoniumcarbamat in Harnstoff:— Es wurde mit der Füllung von 0,9, d. h. 0,9 g Ammoniumcarbamat in 1 ccm von Reaktionsraum, die Einflüsse des Heizdauers und der Temperatur auf die Umsetzung von Ammoniumcarbamat in Harnstoff studiert. Die Resultat sind in der folgenden Tabellen veranschaulicht.

t °C	Heizdauer (St).	Umsetzung %	t °C	Heizdauer (St).	Umsetzung %
130	4	0,90	140	15	41,55
"	6	2,92	"	20	42,69
"	10	6,46	"	30	42,71
"	15	15,36	145	1	9,75
"	20	32,32	"	2	27,91
"	30	39,61	"	3	38,29
"	40	40,59	"	4	41,09
"	64	40,66	"	6	42,32
135	4	2,30	"	10	42,49
"	6	10,41	"	15	42,69
"	10	26,84	"	20	43,53
"	15	40,30	"	30	43,65
"	20	41,15	150	1	27,10
"	30	41,54	"	2	38,73
"	40	41,62	"	3	42,00
140	1	1,74	"	4	43,10
"	2	4,42	"	6	43,45
"	3	18,06	"	10	43,76
"	4	32,15	"	15	44,37
"	6	36,95	"	20	44,88
"	10	39,88	"	30	44,88

155	1	38,02	160	0,5	34,51
"	2	44,10	"	1	43,33
"	3	45,19	"	2	45,85
"	4	46,29	"	3	47,83
"	6	46,39	"	4	47,85

Nach diesem Resultat ist es ganz klar, dass die Reaktionsgeschwindigkeit wächst bemerkenswerdige Weise von 145°C, wo der Schmelzpunkt von Ammoniumcarbamat sich befindet, das eine ganz arme Wärmeleitfähigkeit besitzt. Bei 160°C ist das Gleichgewicht schon inner 4 Stunden erreicht. Zum praktischen Zwecke ist es sehr wichtig, in kurzer Heizung eine Umsetzung von über 35% zu erzielen.

Verglichen das Resultat des Autors mit den der anderen Autoren, dann ist die Überlegenheit dieses Resultates über anderen betrifft der Umsetzung von Ammoniumcarbamat in Harnstoff unstrittig, wie die folgende Tabelle zeigt:

t °C	Heizdauer (St.)	Tokuoka		Andere Forscher		
		Füllung	Umsetz. (%)	Füllung	Umsetz. (%)	Name
145	1	0,9	9,75	0,5	14,3	a.
"	1	—	—	0,15	15,63	b.
"	2	0,9	27,91	0,5	25,2	b.
"	2	—	—	0,19	20,85	a.
150	1	0,9	27,10	—	16,7	b.
"	2	0,9	38,73	0,4	32,48	a.
"	2	—	—	—	33,5	b.
155	1	0,9	38,02	0,84	1,05	c.
"	2	0,9	44,10	0,80	23,17	c.
160	0,5	0,9	34,51	keine Beispiele		
"	1	0,9	43,33	"		

a: Matignon et Fréjacques (1922). b: Krase and Gaddy (1922). c: Neumann und Sonntag (1931).

Die Überlegenheit des Autors in bezug auf die Umsetzung von Ammoniumcarbamat ist dadurch zu erklären, dass der Autor die rotierende Heizbombe gebraucht hat, während bei den anderen Forschern stillgelegte Heizbombe benutzt wurde. Die Versuchseinrichtung des Autors entspricht den praktischen Bedingungen viel mehr als die der Anderen Forscher.

§ 2. Die Einflüsse der Füllung auf die Umsetzung von Ammoniumcarbamat in Harnstoff:— Fichter und Becker haben schon beobachtet, dass die Füllung bei der Umsetzung von Ammoniumcarbamat eine grosse Rolle spielt. Der Autor hat bei den Füllungen von 0,1, 0,3, 0,5 und 0,9 und bei den Temperaturen von 140, 145 und 150°C diese Beziehung untersucht. Die

Resultate des Autors haben auch die Anschauung von Fichter und Becker bestätigt, d. h. die Umsetzung von Ammoniumcarbamat in Prozentansatz ist bei den grösseren Fällung immer grösser als bei den kleineren ist, weil die Zersetzungsprodukte von Ammoniumcarbamat in Gasphase in dieser Umsetzung nicht direkt teilnimmt.

Influence of Fertilizers on the Soil reaction. Part II. (pp. 118 ~123): By Chikafumi ICHIKAWA. (Agr. College of Gifu, Japan.)

(1) Influences of fertilizers on the soil reaction were investigated on fifteen kinds of soil.

(2) The titration acidity is increased markedly by NH_4NO_3 and $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, while by Na_2HPO_4 and K_2HPO_4 the acidity seems to be effected very little and by NaNO_3 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, CaCO_3 and KNO_3 alleviated.

(3) The quantity of iron and aluminium exchanged is very much increased by applying KNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ and CaCO_3 , while decreased slightly by NaNO_3 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, NH_4NO_3 and K_2HPO_4 .

On the Mould of Soy-bean Cake. (pp. 124 ~146): By Sajiro OTOMO. (Agr. Chem. Laboratory, Imp. University of Tokyo.)

Studies on the Castor-bean Lipase. VII.—On the relationship between the activity of the highly active ricinus-lipase and some oxidising and reducing substances. (pp. 147 ~156): By Etsuo TAKAMIYA. (Biochemical Laboratory, Department of Agriculture, Kyushu Imperial University, Fukuoka, Japan.)

As a new fact was discovered as described in the previous paper that the highest active lipase is very sensitive to some oxidising and reducing substances, it is studied in details in this paper on the relationship between the activity of the lipase (olive oil solution of the highest active lipase is used as a lipase preparation) and the oxidising and reducing substances (namely, air, H_2O_2 , cysteine, cystine, glutathione, glucose, fructose, formaldehyde and Na-bisulfit).

The experimental results are as follows: activity of the lipase is retarded by air and H_2O_2 , and activated or retarded by cysteine and glutathione according to the difference of amount and pH of medium. Cystine has no influence to the activity and glucose, fructose, formaldehyde and Na-bisulfit

are conceived to be in the same relation as well as cysteine and gultathione. For example, the experimental data in the case of glutathione are as follows.

Glutathione added (mg)	Degree of hydrolysis (%)		
	pH=4.7	pH=5.6	pH=6.0
0	12.9	33.6	36.0
0.5	—	—	34.5
1.0	—	34.4	33.8
2.0	—	32.6	—
2.5	14.1	—	32.9
5.0	14.7	—	32.9
7.5	13.3	—	—

The influence of cysteine and glutathione upon the activity of the lipase is clearly due to their reducing property but not to the size of their molecules. Some part of glutathione added, of course, is consumed to neutralise the oxidising power of air or reaction medium during estimation of activity which estimation was performed according to Willstätter's method. The experimental results indicate the existence of an opt. amount of glutathione for the best action of lipase, namely, of an opt. zone of oxidation-reduction potential. It is suggested that an opt. rH may exist on the activity of the ricinus-lipase (spermatolipase).

Ueber die Begünstigung des Azotobakter-Wachstums durch mineralische Stoffe aus Bodenextrakten (Fortsetzung). (Vol. 10, No. 5, S. 510~520): Von K. KONISHI und T. TSUGE. (Aus dem Agrikultur chemischen Institut der Kaiserlichen Universität zu Kioto.)

In dieser Mitteilung wollen wir auf Grund der Ergebnisse von weiter fortgeführten Versuchen über die Erdextraktasche darauf aufmerksam machen, dass der V-gehalt in derselben ein den Azotobakter-Wachstum beschleunigender Faktor sein muss.

Vermittelst der mit gewissen Arten der Knöllchenbakterien gezuchteten Schüttelkulturen, war die "gut" Erdextraktasche auf dem Mannit-Hefeextrakt-Agar System etwas mehr oxidativen Zustand auszuüben vermutet, weil die Bakterienplatte unter dieser Bedingung sich etwas tiefer gebildet hat, als die bei der Kontrolle. Bei der mit dieselben zugefügten Mannit-Agar Medium für unsere Azotobakterkultur, muss der analogische Zustand sich hervorbringen. Wenn wir die von Blom⁽¹⁾ vorgeschlagene Hypothese annehmen, sei es kaum geeignet zu sagen, dass solche als Oxidant bewirkende Substanz günstig die biologische N-fixation zufördern vermag.

Dies auf Wachstum wirkende Bestandteil des Auszugs aus Erdextraktasche bewies sich dialysierbar zu sein, sowohl als andere metallische Salzen, weil in der von diesem dialysierten Teil hergestellten Nährlösung sehr kräftigeres Wachstum stattfand als ohne Zusatz. Und mittelst der Spektralanalyse war die Menge des V in diesem Teil im Vergleich mit der von "schlecht" Erdextraktasche oder Tschernosemextraktasche gross.

Aus 20 Erdextraktaschen, welche Wirksamkeiten auf dem Wachstum zu variieren gefunden waren, wurden 8 bei verschiedenen Erdextraktaschen in weiteren Grenzen variierten Proben ausgewählt und mit dem heissem Wasser ausgezogen zum Zweck für Spektralanalyse wie bei der vorstehend berichteten Arbeit.⁽²⁾ Spezielle Beziehung zwischen dem Vanadiningehalt der Aschen, ausschliesslich die besonders weniger oder mehr an Alkali- oder Erdalkalimetallen reichliche Asche, und ihrer Wirksamkeit auf dem Wachstum sich befand wie bei dem Falle mit 3 Proben aus Dahlem.

Zu den am Vanadiningehalt sich unterschiedenen Erden wurden Natriumvanadatlösungen von verschiedenen Konzentrationen vorläufig gefügt, womit wir den Wassergehalt auf trockenen Erden zu 18 Prozent stehen liessen. Die Extraktasche wurde hergestellt aus jeder befeuchteten Erde ebenso wie aus der ursprünglicher, und die Kultur mit Erdextraktaschen durch Erlenmyertechnik ausgeführt um den Effekt von Vanadinzusatz auf Azotobakter-Wachstum zu beweisen. Deutlich war er bei der an Vanadin unzureichenden Erde, wenn die Vanadinlösung vorläufig hinzugefügt war. Diese Tatsache war auch anerkannt bei weiter eingehenden Versuchen über zwei Erdproben aus Osaka, die sich an V-gehalt spektrographisch oder durch der chemischen Analyse nach Moore unterschieden: das ist 0.036% in einer gegen 0.144% in ander.

Obgleich seine Konzentration, welche die höchst beschleunigende Wirkung auf dem Wachstum ausüben konnte, noch schwer bestimmbar war, doch steht es kein Zweifel dass bei Darreichung geringeres Gaben von Vanadinsalz zur Erde ein stärkeres Wachstum stattfindet.

Die bestimmung der Zahl der vermehrungsfähigen Zellen nach gewisser Zeit wurde gemacht auf Plattenkulturen, welche von der mit Na-vanadatlösungen in verschiedenen Konzentrationen hinzugefügten Erden vorbereitet waren. Die eingesäte 30,000 Zellen pro 1 g Erde nach 5 Tage auf 11,800~40,600 Tausend in der 0.14 mg Na-vanadat haltigen und 3,600~7,200 Tausend in der originalen Erdprobe. Also scheint es uns darauf, dass der Gesamtkeimgehalt in Erde wahrscheinlich mehr oder minder bei Zugabe des Vanadins in geringerer mengen zunehmen mag.

Einerseits am Ende drei Wochen Kulturdauer, wurden der V-gehalt in der auf 3 Liter 3.5 mg Na-vanadat oder 5.7 mg VCl₃ enthaltenen Nährlösung und der in dem klar abzentrifügten Substrat aus der gut gewachsenen Azotobakterkultur nach chemischer Methode bestimmt, und beide Mengen wurden

voneinander verglichen ob das Vanadin aus dieser Nährlösung in der Bakterienzellen fest gebunden war. Andererseits für die Spektralanalyse wurde die Bakterienmasse aus der beträchtlich gewachsenen Kultur in der Lösung, die auf ein Liter jeder M/100,000 Na-vanadat, VCl_4 oder ohne Vanadin enthalten hat, mittelst des Zentrifugieren gesammelt und behandelt dializierbare Substanzen möglichst zu entfernen. Auf dem Grund beider experimentalen Ergebnissen scheint es uns darauf zu erweisen, dass das Vanadin innerhalb der 3 Wochen durch Azotobakter wahrscheinlich schwer entferntem Zustand fixiert worden muss.

Der Verbrauch des Sauerstoffs durch den Azotobakter-Wachstum in dieser verschiedenen Nährlösung wurde beziehungsweise untersucht mit Warburg's Respirationsmanometer, und der von Atmosphäre aus fixierten Stickstoff gleichzeitig nachgewiesen. Es war von uns darauf hingewiesen, dass die Beeinflussung der Atomung durch jeder Asche etwas verschieden stattfand. Innerhalb ersten 48 Stunden trat die mehr wirkende Erdextraktasche enthaltene Kultur mit langsamer Geschwindigkeit hervor, und nach längerer kulturdauer erhob sich etwas grössere Atomung, wobei war der Stickstoff mehr gebundet.

Die gleichartige Neigung an Respirationszeitkurven war auch nachweisbar bei dem künstlichen Substrat mit Vanadinsalz. Es scheint uns darauf dass bei beiden Versuchsserien viele Ähnlichkeit im physiologischen Verhalten sich befand. Dass diese hier berichteten Ergebnisse unserer Untersuchung physiologisch auf der beschleunigenden Wirkung der Erdextraktasche hindeutet muss eine gewisse Bestätigung sein.

Studies on the assimilation of nitrites by fungi. Part I.—A new culture medium for moulds. (Vol. 10, No. 16 pp. 459~476): Kinichiro SAKAGUCHI and Yin-Chang-WANG. (Agricultural Chemical Laboratory, Tokyo Imperial University.)

Nitrites have been regarded to be poisonous for most microorganisms, except certain groups of soil organisms such as nitrifying or nitrate reducing bacteria. One of the authors (Sakaguchi⁽¹⁾) has observed recently that a mould associated to the *Aspergillus oryzae* group made a luxuriant growth upon a medium containing sodium nitrite as a sole nitrogen source, producing a considerable quantity of citric acid. In the present work, the authors have studied about the nutritive value of nitrites as a nitrogen source for various microorganisms, especially for moulds. The summary of the results obtained are as follows⁽²⁾.

(1) The nutritive values of sodium- and potassium nitrite were compared with those of sodium-, potassium- and ammonium nitrates for *Asp. oryzae*

A, *Asp. glaucus*, *citromyces* sp. and *Pen. wortomani*, using Czapek's and Pfeffer's solutions, which were free from the nitrogen sources, as basal nutrient solutions.

(2) The proper quantities of the nitrites in the above media were found to be ranged from 0.1 to 0.25 percent. The moulds tested were less sensitive to sodium nitrite than to the potassium salt, and so to the solid agaragar media than to the liquid media of the same composition. As regard to the reaction of the culture media, the neutral or slightly alkaline reaction seems to be more suitable than the acid for the growth of the moulds.

(3) In the course of the cultivation of *Asp. Oryzae* A upon nitrite media, the nitrite added was gradually consumed, but no formation of nitrate was found.

(4) Our new medium, which is prepared by substituting NaNO_2 (2 grs per litre) for NaNO_3 of the Czapek's solution, is very stable, standing the sterilization and the storage at 30°C for more than fifty days. This medium is more favorable than the original Czapek's solution or even than the pfeffer's solution for certain groups of moulds, such as *Asp. oryzae* and its associates. It is suitable for most *Aspergilli*, except some species belonging to *Asp. niger* group, and also suitable for most species of *Penicillium* and *Verticillium*.

(5) Most members of *Mucor*, *Rhizopus*, *Absidia*, *Oidium* or *Monilia*, yeasts and bacteria do not generally grow well on this medium, except few species which are able to attain luxuriant growth. By means of this nitrite medium, we will therefore be able to differentiate those microorganisms according to the assimilability of the nitrite.

(6) Our medium may be employed not only for maintaining pure cultures, but also for determining the identity of moulds or isolating certain narrow groups.

LITERATURE

- (1) Sakaguchi: The Journal of the Japanese Brewing Association, Vol. 25, No. 8.
- (2) The original paper in Japanese: This Journal, Vol. 10, No. 116, p. 459~476. (1934).